



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C07K 14/415, A61K 38/16, 7/075, 7/48</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 97/14713</b>
			<b>(43) Date de publication internationale:</b> 24 avril 1997 (24.04.97)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR96/01620			<b>(81) Etats désignés:</b> JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(22) Date de dépôt international:</b> 16 octobre 1996 (16.10.96)			
<b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 95/12137 17 octobre 1995 (17.10.95) FR			
<b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> COLETICA [FR/FR]; 32, rue Saint-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR).			
<b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> PERRIER, Eric [FR/FR]; 23, boulevard F.-Point, F-38200 Vienne (FR). HUC, Alain [FR/FR]; 26, chemin des Santons, F-69110 Sainte-Foy-lès-Lyon (FR). ANTONI, Danielle [FR/FR]; 23, domaine des Essarts, Chemin du Rossignol, F-69390 Vernaison (FR). ROUSSEL, Coralie [FR/FR]; 9, rue du Plein-Soleil, F-34470 Perols (FR). PINAL, Michel [FR/FR]; 6, rue des Tonnelles, F-34080 Montpellier (FR). GRAILLE, Jean [FR/FR]; 4, rue La Copelette, F-34750 Villeneuve-les-Maguelonne (FR).			
<b>(74) Mandataires:</b> LE ROUX, Martine etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).			
<b>(54) Title:</b> AMPHIPHILIC COMPLEXES, METHOD FOR PREPARING SAME AND COMPOSITIONS CONTAINING SUCH COMPLEXES			
<b>(54) Titre:</b> COMPLEXES AMPHIPHILES, PROCEDE POUR LEUR PREPARATION ET COMPOSITIONS EN RENFERMANT			
<b>(57) Abstract</b>  Novel amphiphilic complexes, a method for preparing same and compositions containing such complexes, are disclosed. Said amphiphilic complexes are produced by reacting one or more proteins having an average molecular weight of at least 5000 Daltons with one or more C <sub>4-30</sub> fatty chains selected from fatty acids, fatty alcohols, fatty amines and derivatives thereof except for undecylenic acid, at a temperature between room temperature and 80 °C, the weight ratio of the reagents [protein(s):fatty chain(s)] being from 1/1 to 1/10, advantageously 1/3 to 1/5.			
<b>(57) Abrégé</b>  La présente invention a pour objet de nouveaux complexes amphiphiles, un procédé pour leur préparation et les compositions en renfermant. Lesdits complexes amphiphiles résultent de la réaction, à une température comprise entre la température ambiante et 80 °C, entre d'une part une (ou plusieurs) protéine(s), dont la masse moléculaire moyenne est supérieure ou égale à 5.000 Daltons et d'autre part, une (ou plusieurs) chaîne(s) grasse(s) dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 4 et 30 choisie(s) parmi les acides gras, les alcools gras, les amines grasses et leurs dérivés à l'exclusion de l'acide undécylénique; le rapport pondéral des réactifs [protéine(s)/chaîne(s) grasse(s)] variant de 1/1 à 1/10 et avantageusement de 1/3 à 1/5.			

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Complexes amphiphiles, procédé pour leur préparation et compositions en renfermant

La présente invention a pour premier objet des complexes amphiphiles (hydrolipidiques) et plus précisément des protéines (et polypeptides) sur lesquelles  
5 ont été greffées des chaînes grasses. On peut qualifier lesdits complexes de protéines (et polypeptides) lipophilisées. La présente invention a également pour objets des compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires renfermant de tels complexes et des procédés pour la préparation desdits complexes.

10 La peau peut être considérée comme un organe qui sépare et protège le corps humain de son environnement. Cet effet de barrière contre les agressions extérieures est capital pour que les tissus internes puissent exercer convenablement leur fonction. Les agressions extérieures sont en effet multiples : agressions lumineuses (UVA, UVB, infra-rouges) qui provoquent radicaux libres et  
15 fragmentation des constituants de la peau, agressions physiques ou mécaniques (frottements, variations de température et d'hygrométrie ...) qui provoquent des inflammations, agressions chimiques (pollution de l'air, de l'eau, contact avec des éléments irritants ou immunogènes), agressions microbiologiques (bactéries, virus, champignons ...). Afin de réagir à ces différentes agressions, la peau dispose d'un  
20 certain nombre de cellules spécialisées, formant parfois des structures extrêmement bien caractérisées. C'est le cas des cornéocytes qui, différenciés à partir des kératinocytes, forment une structure appelée Stratum corneum, qui est spécialisée dans la protection des zones plus internes de la peau. Cette structure cornée superficielle est la première protection vis-à-vis des agressions extérieures.

25 L'utilisation de produits cosmétiques et notamment de produits d'hydratation se heurte également à cette barrière naturelle :

– de par leur petite taille, des molécules hydrophiles de petite masse moléculaire comme l'urée, l'acide lactique, les acides aminés, peuvent pénétrer via le Stratum corneum, jusque dans des couches plus profondes des tissus cutanés.  
30 L'effet cosmétique obtenu est un effet hydratant des couches profondes de l'épiderme et du derme, effet généralement relativement court;

– par contre, des molécules de plus haute masse moléculaire comme les protéines par exemple ne peuvent pas franchir cette barrière. En effet, le Stratum corneum est principalement constitué de lipides (sa teneur en lipides est  
35 proche de 80 % en poids), ce qui lui donne un caractère particulièrement hydrophobe, totalement incompatible avec le caractère hydrophile de la plupart des

protéines utilisées dans le domaine cosmétologique. Dans ce cas, l'effet cosmétique obtenu est un effet filmogène, parfois intéressant pour l'obtention de textures ou de "touchers cosmétiques" particuliers, mais qui reste totalement et exclusivement superficiel.

5           Ainsi, et par voie de conséquence, les molécules hydrophiles utilisées à ce jour en cosmétique sont repoussées par cette structure hydrophobe et soit restent en surface soit pénètrent très profondément dans le derme. De ce fait, la couche cornée et les couches supérieures de l'épiderme ne subissent pratiquement aucune influence des substances actives et notamment hydratantes utilisées à ce jour en  
10 cosmétique. Or, l'impression de sécheresse de la peau provient du Stratum corneum et des couches supérieures de l'épiderme. Il est donc capital de parvenir à hydrater efficacement cette structure et plus généralement de rendre accessible à diverses entités hydrophiles ladite structure.

          La Demanderesse, dans le cadre de la présente invention, a abordé ce  
15 problème technique de l'hydratation de la peau et plus généralement celui de l'optimisation de l'expression de l'activité de molécules du type protéine ou polypeptide au niveau du Stratum corneum. Pour résoudre ledit problème technique, elle propose de modifier le caractère physico-chimique desdites molécules et d'en modifier ainsi le comportement. Elle propose en fait de générer  
20 des complexes amphiphiles en greffant des chaînes grasses sur lesdites molécules. Les pénétrations trans-épidermiques de tels complexes sont différentes de celles des molécules non complexées. Leur stabilisation dans les couches supérieures de l'épiderme ainsi que sur la fibre capillaire (cheveux) a été mise en évidence. Par ailleurs, on a observé, des propriétés cosmétiques voire thérapeutiques desdits  
25 complexes, fort intéressantes et inattendues.

          Il a été décrit, dans la demande de brevet FR-A-2 671 725 des complexes polyoses-acides gras qui présentent des propriétés hydratantes et émulsionnantes. Ces complexes sont obtenus en faisant réagir, en milieu aqueux, à la température ambiante, des acides gras sous forme réactive avec des polyoses.  
30 Lesdits polyoses peuvent intervenir sous forme impure et notamment en mélange avec des protéines. Toutefois, dans ce document, il n'est fait aucune mention d'un complexe "binaire" protéine-acide gras et des quelconques propriétés intéressantes qu'il pourrait présenter ... En tout état de cause, les polysaccharides (polyoses) présentant un pouvoir gélifiant bien supérieur à celui des protéines, on ne pouvait  
35 s'attendre à obtenir des complexes hydratants et émulsionnants en lipophilisant de

telles protéines. Tel est pourtant l'un des résultats obtenus dans le cadre de la présente invention ...

Il a également été décrit :

- 5      - dans le brevet US-A-4,234,475 un procédé de préparation d'émulsionnants qui consiste à faire réagir, à des températures supérieures à 200°C, une protéine et un acide, notamment un acide gras. A de telles températures, on ne peut éviter la dégradation de chacun des réactifs, et notamment celle de la protéine (dénaturée et/ou hydrolysée en peptides), dont les propriétés sont en conséquence inéluctablement altérées ;
- 10      - dans la demande WO-A-93 22370 des dérivés de l'acide undécylénique obtenus en faisant réagir ledit acide, sous forme réactive, en milieu aqueux, à la température ambiante, avec une macromolécule organique hydrophile possédant des groupements alcools primaires et/ou amines primaires et notamment avec une protéine. Lesdits dérivés, très faiblement odorants, ont conservé des
- 15      propriétés anti-fongique et anti-bactérienne. On a surtout cherché, par leur biais, à optimiser l'expression des activités de l'acide undécylénique.

Par ailleurs :

- 20      - la demande DE-A-34 22 496 décrit une composition alcoolique désinfectante de la peau. Ladite composition renferme un hydrolysate de protéines, en fait un mélange d'acides aminés,
- la demande EP-A-0 417 619 propose, à titre de détergent manifestant une agressivité moindre vis-à-vis de la peau et des muqueuses, les produits de condensation résultant de la réaction chimique entre :

- 25      - un hydrolysate de protéines dont la masse moléculaire moyenne est comprise entre 3 000 et 7 000 ;

et

- un acide gras en C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> ;

ladite réaction chimique étant mise en oeuvre à un pH compris entre 7 et 12 et le rapport molaire protéine(s)/acide(s) gras variant de 1/0,5 à 1/3 ;

- 30      - la demande EP-A-0 283 601 décrit des dérivés d'élastine préparés à partir d'élastine hydrolysée. Lesdits dérivés résultent d'un couplage chimique entre ladite élastine hydrolysée (non native) et un anhydride d'acide gras ; ledit acide gras intervenant, par rapport à la protéine (élastine hydrolysée) en un rapport pondéral très inférieur à 1.

Lesdits produits de condensation selon EP-A-0 417 619 et dérivés d'élastine selon EP-A-0 283 601 ne sont pas des complexes au sens de l'invention. Lesdits complexes de l'invention sont toujours élaborés en présence d'un excès d'acide gras et peuvent être élaborés avec des protéines natives. Ceci est explicité ci-après.

La Demanderesse propose en fait de nouveaux complexes amphiphiles ou hydrolipidiques – complexes protéine(s)/chaîne(s) grasse(s) – qui, comme indiqué ci-dessus, présentent des propriétés cosmétiques voire thérapeutiques fort intéressantes et relativement inattendues.

On précise ici que, dans le présent texte – dans le contexte de l'invention – on emploie le terme protéine pour désigner aussi bien une "réelle" protéine qu'un polypeptide (obtenu éventuellement par synthèse).

Lesdits complexes de l'invention sont, de façon caractéristique, obtenus à l'issue de la réaction, mise en oeuvre à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, entre :

- d'une part, une (ou plusieurs) protéine(s), dont la masse moléculaire moyenne est supérieure ou égale à 5 000 Daltons;

et

- d'autre part, une (ou plusieurs) chaîne(s) grasse(s), dont le nombre de carbone est compris entre 4 et 30, choisie(s) parmi les acides gras, les alcools gras, les amines grasses et leurs dérivés, à l'exclusion de l'acide undécyclénique, le rapport pondéral des réactifs [protéine(s)/chaîne(s) grasse(s)] variant de 1/1 à 1/10 et avantageusement de 1/3 à 1/5.

La réaction mise en jeu pour le couplage et/ou greffage des réactifs peut être de type chimique ou enzymatique. Ceci sera précisé plus avant dans le présent texte. En tout état de cause, elle est mise en oeuvre à une température bien inférieure à 200°C, inférieure à 100°C. On souhaite minimiser voire éviter toute dégradation des réactifs et notamment des protéines intervenantes.

Ladite réaction est mise en oeuvre avec deux types de réactifs : d'une part, au moins une protéine, d'autre part au moins une chaîne grasse. Lesdites chaînes grasses consistent aussi bien en des acides gras que des alcools gras ou amines grasses (ou en les dérivés desdits acides, alcools et amines).

On peut d'ores et déjà insister sur la multiplicité et la variété des complexes de l'invention et donc des propriétés qu'ils sont susceptibles de présenter; ces dernières dépendant de la nature des réactifs (protéine(s) et chaîne(s))

grasse(s)) intervenants et de leurs caractéristiques intrinsèques (par exemple, nature de la protéine intervenant, pureté de celle-ci, poids moléculaire de celle-ci).

On précise ci-après, chacun des deux types de réactifs.

Les complexes de l'invention sont des complexes de protéines et de chaînes grasses. Sont exclus du cadre de ladite invention les complexes obtenus à partir d'acides aminés, que ceux-ci soient purifiés ou obtenus en mélange lors de l'hydrolyse d'une protéine ainsi que les complexes obtenus à partir de peptides ne renfermant que 2 à 5 acides aminés dans leur structure. Les protéines susceptibles d'intervenir dans la structure des complexes de l'invention ont une masse moléculaire moyenne égale ou supérieure à 5 000 Daltons. Ils consistent en un enchaînement d'acides aminés liés entre eux par des liaisons amides, qui présente des fonctions amines et/ou acides et/ou alcools pendantes.

Généralement, leur masse moléculaire moyenne est inférieure à 1 000 000 Daltons. Il n'est toutefois nullement exclu de préparer des complexes de l'invention avec des protéines d'une masse moléculaire moyenne supérieure. Avantagusement, les complexes de l'invention sont préparés à partir de protéines, dont la masse moléculaire moyenne est comprise entre 10 000 et 1 000 000 Daltons. De façon encore plus avantageuse, on fait intervenir des protéines dont la masse moléculaire moyenne est comprise entre 20 000 et 300 000 Daltons.

En tout état de cause, les protéines intervenantes peuvent être obtenues par une extraction ne détruisant pas leur structure et/ou ne diminuant pas leur masse moléculaire ou par hydrolyse physique, chimique ou enzymatique modérée d'entités de masse moléculaire plus élevée (ladite hydrolyse générant des protéines dont la masse moléculaire moyenne est au moins égale à 5 000 Daltons).

Lesdites protéines intervenantes peuvent être issues d'animaux (bovins, ovins, poissons, requin, crustacés ...) et dans ce cas, elles peuvent être extraites de différents tissus; citons par exemple le collagène, la gélatine, l'albumine, l'ovalbumine, l'élastine, la réticuline, la fibronectine, la kératine, la soie, la laminine, la desmosine et l'isodesmosine, les protéoglycannes de la matrice extracellulaire, les caséines, la lactalbumine, les lactoglobulines, les enzymes extraites de tissus animaux, etc ... Elles peuvent être issues de plantes (blé, algues unicellulaires ou multicellulaires, maïs, pois, lupin ...) et dans ce cas, elles peuvent être extraites de graines, de fleurs, de fruits, d'écorces, de gommes, etc ... ; citons pour exemple les protéines ou hydrolysats modérés de blé, de maïs, de coton, de

lupin, de pois, de fève, d'amande, de féverole, de soja, de tournesol, de luzerne, d'avoine, etc ...

On prépare avantageusement des complexes de l'invention avec des protéines de soja, de blé, d'avoine ou d'amande.

5 Pour ce qui concerne le deuxième type de réactifs, il s'agit comme déjà précisé, de chaînes grasses comportant de 4 à 30 atomes de carbone. Avantageusement, les chaînes grasses intervenantes comportent de 6 à 20 atomes de carbone. Elles peuvent être saturées ou insaturées, linéaires, branchées ou cycliques. Elles présentent évidemment des fonctions acide et/ou alcool et/ou  
10 amine mais il n'est nullement exclu qu'elles présentent d'autres fonctions chimiques dans leur structure qui interviennent ou n'interviennent pas dans la préparation des complexes de l'invention.

Lesdites chaînes grasses peuvent notamment être choisies parmi les acides gras heptanoïque, octanoïque, décanoïque, laurique, myristique, palmitique,  
15 stéarique, ricinoléique, oléique, linoléique, linolénique; les alcools gras et amines grasses correspondants; les dérivés desdits acides gras, alcools gras et amines grasses ; et leurs mélanges.

On prépare avantageusement des complexes de l'invention :

- avec les acides laurique, stéarique ou palmitique et notamment les  
20 acides stéarique et palmitique en mélange;
- avec de la laurylamine ou de l'hexadécylamine;
- avec du décylalcool.

On a vu que lesdites chaînes grasses consistent en des acides gras, des alcools gras ou des amines grasses (ou leurs dérivés). Pour la préparation des  
25 complexes de l'invention par voie chimique, lesdits acides gras interviennent éventuellement sous des formes réactives (plus réactives), et notamment sous la forme d'halogénures (chlorures, bromures, iodures ...), d'anhydrides ou de dérivés d'anhydrides.

Au sein de la structure des complexes de l'invention, le rapport  
30 pondéral [protéine(s)]/[chaîne(s) grasse(s)] varie de 1/1 à 1/10 et préférentiellement de 1/3 à 1/5.

On fait, en fait, toujours réagir la (les) protéine(s) avec un excès plus ou moins large de chaînes grasse(s) dans le but de créer des liaisons covalentes mais aussi des liaisons de type ionique, hydrogène, Van der Waals.

35 Par ailleurs, généralement, à l'issue de la réaction, on ne récupère pas les chaînes grasses qui n'ont pas réagi, qui ne sont pas liées à la protéine, on ne



cherche pas à isoler des complexes "binaires" du type : protéine(s)-chaînes grasses purs. Ainsi, les complexes de l'invention consistent-ils généralement en des complexes "binaires" du type indiqué ci-dessus en mélange avec des chaînes grasses non liées ; en d'autres termes, en le produit de la réaction de couplage en  
5 mélange avec les chaînes grasses qui n'ont pas réagi (qui ne sont pas couplées).

Lesdits complexes constituent le premier objet de la présente invention. Les compositions, notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires, en renfermant constituent le second objet de ladite invention.

Lesdites compositions renferment généralement de 0,01 à 40 % en  
10 poids de tel(s) complexe(s) et avantageusement de 0,1 à 10 % en poids.

Plus précisément, font partie intégrante de la présente invention, les compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques ou alimentaires qui renferment, à titre d'ingrédient actif, au moins une protéine ; ladite protéine intervenant, au moins en partie (voire en totalité) sous la forme d'un complexe tel  
15 que décrit ci-dessus. Pour l'élaboration desdites compositions on peut utiliser ledit complexe, purifié (isolé du milieu réactionnel dans lequel il a été synthétisé) ou en mélange avec l'un et/ou l'autre des réactifs qui sont intervenus dans sa synthèse. Selon cette seconde variante, on utilise avantageusement le milieu réactionnel (à l'issue de la réaction) renfermant ledit complexe et les réactifs n'ayant pas réagi  
20 (principalement des chaînes grasses dans la mesure où elles interviennent en excès).

Font également partie de l'invention, les compositions où lesdits complexes interviennent à titre d'agents émulsionnants.

En tout état de cause, on a constaté, de manière surprenante, que les  
25 complexes de l'invention présentent des propriétés hydratantes et émulsionnantes. Ceci est relativement inattendu dans la mesure où l'homme du métier n'ignore pas que les protéines ont un pouvoir de piéger l'eau bien inférieur à celui des polysaccharides et où ledit pouvoir, relativement faible dans l'absolu, aurait dû être affecté par la lipophilisation desdites protéines.

30 Outre ces propriétés hydratantes et émulsionnantes – relativement inattendues – les complexes de l'invention ont montré d'autres propriétés – totalement inattendues.

C'est ainsi qu'une protéine de blé soluble, possédant une masse  
moléculaire moyenne de 100 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acides  
35 stéarique et palmitique ont été greffées, présente des propriétés de restructuration cutanée extrêmement fortes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine

lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des applications où une destructuration de l'épiderme est observée (agressions physico-chimiques ou vieillissement cutané ...).

De même, une protéine d'amande soluble, possédant une masse  
5 moléculaire moyenne de 30 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acides stéarique et palmitique ont été greffées, présente la propriété de calmer des érythèmes solaires modérés à forts, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des formulations solaires ou après solaires.

10 De même, une protéine de laminaire insoluble, possédant une masse moléculaire moyenne de 10 000 Daltons, sur laquelle des chaînes d'acide caprylique ont été greffées, présente la propriété d'inhiber un certain nombre de micro-organismes, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cette protéine lipophilisée (complexe au sens de l'invention) dans des applications où la  
15 destruction des micro-organismes est envisagée (effets anti-acné, effets anti-pelliculaire, effets anti-odeurs corporelles, conservateur naturel ...).

On a précédemment insisté sur la diversité des complexes de l'invention. On saisit ici tout l'intérêt d'une telle diversité.

Par ailleurs, on rappelle ici que les propriétés des complexes de  
20 l'invention, qu'elles soient plus ou moins inattendues, s'expriment au niveau souhaité, au niveau du Stratum corneum, de par leur lipophilisation.

Les compositions de l'invention consistent donc essentiellement en des compositions cosmétiques. Il n'est pas exclu qu'ils s'agissent de compositions thérapeutiques, alimentaires ou diététiques particulièrement performantes au  
25 niveau des muqueuses.

Selon son troisième objet, l'invention concerne un procédé pour la préparation des complexes amphiphiles (hydrolipidiques) décrits ci-dessus. Ledit procédé comprend, de façon caractéristique, la réaction, à une température comprise entre la température ambiante et 80 °C, si nécessaire en milieu aqueux ou  
30 solvant, entre au moins une protéine du type précité et au moins une chaîne grasse du type précité, lesdits réactifs intervenants dans un rapport pondéral [protéine(s)/chaîne(s) grasse(s)] compris entre 1/1 et 1/10, avantageusement entre 1/3 et 1/5. Ladite réaction peut être qualifiée de réaction de greffage ou plus exactement de couplage (dans la mesure où elle ne génère pas seulement des liaisons covalentes  
35 entre les réactifs).

Ladite réaction est mise en oeuvre à relativement basse température. On minimise ainsi la dégradation des protéines réactives. Elle fait intervenir ou non un solvant, milieu aqueux ou solvant organique. On peut se dispenser de l'intervention d'un tel solvant si, à la température de réaction les réactifs sont  
5 liquides.

A l'issue de la réaction, les complexes "binaires" ne sont généralement pas isolés. Ils se trouvent alors en mélange principalement avec des chaînes grasses qui n'ont pas réagi.

On souhaite généralement ajuster le pH des complexes obtenus, afin de  
10 le rendre compatible avec des applications, notamment cosmétiques, ultérieures. On l'ajuste à des valeurs comprises entre 2 et 10 et plus particulièrement comprises entre 5 et 7. A cette fin, on utilise des agents neutralisants choisis parmi :

- les bases minérales (telles KOH, NaOH,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ...);
- les bases métalliques (sous forme d'hydroxyde, de carbonate ...);
- 15 - les bases organiques (tampons citrates, phosphates, borates, acétates, TRIS ... ; amines ou alkylamines en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_6$  : triéthanolamine, aminométhylpropane ...).

Après la réalisation des complexes dont les pH ont été si nécessaire ajustés à des pH compatibles avec leur utilisation ultérieure (ledit pH est  
20 avantageusement ajusté par dispersion desdits complexes en phase aqueuse), il est possible de les sécher par atomisation, lyophilisation, déshydratation sous vide ... Lesdits complexes séchés, ou directement obtenus sans eau, peuvent être alors mis en forme, notamment sous la forme de copeaux.

La réaction de couplage mise en oeuvre peut être réalisée par voie  
25 chimique ou enzymatique. La voie enzymatique est, dans le contexte de la présente invention, totalement originale.

Selon ladite voie chimique, on peut :

+ faire réagir les chaînes grasses - acides gras, alcools gras, amines grasses - dans des conditions classiques de la synthèse peptidique; i.e. en présence  
30 d'agents bifonctionnels, tels des diimides;

+ faire réagir les acides gras sous des formes réactives (plus réactives), i.e. faire réagir des halogénures (chlorures, bromures, iodures ...) d'acides gras, des anhydrides d'acides gras, des dérivés d'anhydride d'acides gras ...

Selon ladite voie enzymatique, originale, on couple les protéines aux  
35 chaînes grasses en présence d'une enzyme, généralement à une température comprise entre 30 et 70°C. Avantageusement ladite température est comprise entre

50 et 60°C. Avantageusement, l'enzyme intervenant est une acyltransférase. Selon trois variantes de cette voie enzymatique, ladite enzyme est une lipase, notamment choisie parmi les lipases de *Mucor miehei*, de pancréas de porc, de *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus* et d'*Apergillus* ou une protéase, consistant  
5 notamment en la papaïne ou une amidase. Une telle réaction enzymatique assure, comme les réactions chimiques rappelées ci-dessus, le greffage de chaînes grasses sur les protéines. Lesdites chaînes grasses, lorsqu'il s'agit d'acides gras, peuvent intervenir sous forme d'esters (y compris sous forme d'esters de glycérides). L'enzyme présente dans le milieu réactionnel assure, dans un premier temps, la  
10 trans-estérification.

La réaction mise en oeuvre, chimique ou enzymatique, assure le couplage en générant des liaisons covalentes esters et/ou amides. On a vu que ledit couplage fait également intervenir des liaisons ioniques, des liaisons hydrogènes, des liaisons de type Van der Waals...

15 La réaction est avantageusement mise en oeuvre avec une activité de l'eau du milieu réactionnel ( $a_w$ ) comprise entre 0,2 et 1 et avantageusement entre 0,3 et 0,7.

Les procédés de préparation des compositions de l'invention, compositions notamment cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires renfermant  
20 des complexes hydrolipidiques font également partie de l'invention. Ils consistent principalement à mélanger l'ingrédient actif à un excipient convenable. On a vu que ledit principe actif pouvait présenter des propriétés émulsionnantes. Ceci peut se révéler particulièrement intéressant. On peut ainsi limiter voire annuler l'intervention de tout agent émulsionnant synthétique.

25 L'invention est illustrée, sous ses différents aspects, par les exemples ci-après.

Tous les pourcentages indiqués sont des pourcentages en poids, sauf indication contraire.

### 30 Exemple 1 :

#### Préparation d'un complexe protéine de soja-acide laurique (C12)

1 660 g d'acide laurique, de pureté égale à 99 %, sont chauffés jusqu'à 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acide laurique et obtention d'une huile incolore, 470 g d'un isolat de soja (masse moléculaire  
35 moyenne : 50 000 D), contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 300 g de lipase extraite à partir de *Mucor miehei*, immobilisée sur résine échangeuse d'anion macroporeuse (nom commercial : Lipozyme® de la société Novo) sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 15 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 15 jours de réaction, le complexe est filtré à 90°C afin d'éliminer l'enzyme. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées dont environ 16 % des fonctions amines libres (latérales et terminales) ont été greffées par des acides gras (l'acide laurique).

Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 % et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

#### Exemple 2 :

#### Préparation d'un complexe protéine de soja-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)

270 g d'acide stéarique et 180 g d'acide palmitique, chacun de pureté supérieure à 90 %, sont placés dans 1 000 ml de tertiobutanol, puis chauffés jusqu'à 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acides et obtention d'une huile incolore, 150 g d'un isolat de soja (masse moléculaire moyenne : 50 000 D), contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 45 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 21 jours à 55°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 21 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertiobutanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées dont environ 21 % des fonctions amines latérales ont été greffées par des acides gras.

5 Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

**Exemple 3 :**

**Préparation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

10 On procède comme décrit à l'exemple 2 en substituant au 150 g de l'isolat de soja, 150 g d'un atomisat obtenu à partir d'une solution de protéine de blé (masse moléculaire moyenne : 100 000 D). On obtient un complexe du type de celui décrit à l'exemple 2 (copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique).

15 **Exemple 4 :**

**Préparation d'un complexe protéine d'amande-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

20 300 g d'acide stéarique et 140 g d'acide palmitique, chacun de pureté supérieure à 90 %, sont placés dans 1 000 ml d'isopropanol, puis chauffés jusqu'à 60°C dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes d'acides et obtention d'une phase huileuse homogène, 150 g d'un lyophilisat obtenu à partir d'une solution de protéine d'amande (masse moléculaire moyenne : 30 000 D), sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

25 Après obtention d'une suspension homogène, 35 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 12 jours à 55°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

30 Après 12 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. L'isopropanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

35 Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

**Exemple 5 :**

On procède comme décrit aux exemples 2 à 4 mais le solvant intervenant est choisi parmi l'hexane, le chloroforme, le cyclohexane, le chlorométhane, le dichlorométhane, le trichlorométhane, l'éther éthylique, le méthyl-  
5    tertiobutyléther, ou un mélange de ces solvants.

**Exemple 6 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant varier la nature de l'enzyme utilisée : lipase de *Mucor miehei*, de pancréas de porc,  
10    de *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus*, d'*Aspergillus* ou autres acyl-  
transférases.

**Exemple 7 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant  
15    varier la nature de la protéine intervenante : protéine de blé, d'avoine, de maïs,  
d'amande, de soja.

**Exemple 8 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant  
20    varier les paramètres de la réaction de couplage ci-après :

- la proportion entre chaînes grasses et protéines (ou polypeptides) ;
- la température de réaction (entre la température ambiante et 80°C) ;
- le temps de réaction (de 30 minutes à 21 jours).

**Exemple 9 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais en faisant  
varier la nature de l'acide gras intervenant : l'acide heptanoïque (C7), l'acide  
octanoïque (C8), l'acide décanoïque (C10), l'acide laurique (C12), l'acide  
myristique (C14), l'acide palmitique (C16), l'acide stéarique (C18), l'acide  
30    ricinoléique (C18), l'acide oléique (C18), l'acide linoléique (C18), l'acide  
linoléique (C18), d'autres acides gras à chaînes plus courtes ou plus longues,  
saturés, insaturés ou polyinsaturés, utilisés purs ou en mélanges.

**Exemple 10 :**

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais les acides  
35    gras qui sont placés à réagir sur les protéines sont sous formes d'esters, et la lipase

utilisée réalise une réaction de trans-estérification et/ou de trans-acylation. Ainsi, le linoléate d'éthyle, l'oléate d'isopropyle et le linolénate de glycérol ainsi que différentes huiles végétales sous forme de triglycérides (dont l'huile de coprah) ont été utilisés pour fournir la chaîne grasse qui va ensuite venir se greffer sur la protéine.

**Exemple 11 :**

On procède comme décrit dans les exemples 1 à 9 mais les acides gras qui sont placés à réagir sur les protéines sont sous une forme réactive, du type halogénure d'acide ou anhydride d'acide. Dans ce cas, la réaction peut être effectuée dans l'eau, à température ambiante et ne nécessite pas de lipase. De telles réactions sont explicitement décrites aux exemples 17 et 18.

**Exemple 12 :**

On procède comme décrit dans les exemples 1 à 8 mais les chaînes grasses qui sont placées à réagir sur les protéines sont sous une forme alcool (formation de liaisons esters avec les fonctions acide carboxylique de la protéine) ou sous une forme amine (formation de liaisons amides avec les fonctions acide carboxylique de la protéine). De telles réactions sont explicitement décrites aux exemples 14 et 16 ci-après.

**Exemple 13 :**

On procède comme décrit dans les exemples 2 à 12 mais sans utiliser de solvant.

**Exemple 14 :**

**Préparation d'un complexe protéine de soja-décylalcool (C10)**

300 g de décylalcool, de pureté supérieure à 90 %, sont chauffés jusqu'à 60°C, en présence de 670 ml de tertibutanol dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes de décylalcool et obtention d'une huile incolore, 100 g d'un isolat de soja (masse moléculaire moyenne : 50 000 D), contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

Après obtention d'une suspension homogène, 30 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 10 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.



Après 10 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertibutanol est alors éliminé par distillation sous pression réduite. Le complexe ainsi obtenu est mis sous forme de copeaux lors de son refroidissement.

5       Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées par des chaînes grasses, et environ 12 % des alcools gras ont été couplés à la protéine (à l'aide de liaisons covalentes comme des fonctions esters, mais également à l'aide de fonctions ioniques).

10       Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre de copeaux de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

15       Exemple 15 :

On procède comme décrit dans les exemples précédents mais les complexes formés sont dispersés en phase aqueuse et leur pH est ajusté de façon à être compatible avec des formulations cosmétiques, à l'aide d'une base minérale ou organique. Les complexes ainsi obtenus peuvent ensuite être séchés par  
20       atomisation, lyophilisation ou séchage sous vide.

Exemple 16 :

Préparation d'un complexe protéine de soja-laurylamine (C12)

300 g de laurylamine, de pureté supérieure à 90 %, sont chauffés  
25       jusqu'à 60°C, en présence de 670 ml de tertibutanol dans un réacteur sous azote. Après fusion des chaînes de laurylamine et obtention d'une huile jaunâtre, 100 g d'un isolat de soja (masse moléculaire moyenne : 50 000 D), contenant au minimum 96 % de protéines natives, sont alors ajoutés en pluie fine dans le réacteur sous agitation mécanique modérée.

30       Après obtention d'une suspension homogène, 30 g de lipase extraite à partir de *Rhizopus arrhizus* sont ajoutés au réacteur. L'ensemble est conservé 10 jours à 60°C dans un réacteur clos sous agitation mécanique modérée.

Après 10 jours de réaction, le complexe est porté à 90°C pendant 20 min afin d'inactiver toute activité enzymatique résiduelle. Le tertibutanol est  
35       alors éliminé par distillation sous pression réduite. 4 000 ml d'eau sont alors ajoutés au complexe et l'ensemble est porté à 70°C sous agitation modérée ; puis

environ 1,5 moles de HCl (sous forme de solution 6N) sont ajoutées lentement au mélange réactionnel de façon à obtenir un pH compris entre 5,0 et 7,0. Le complexe ainsi obtenu est ensuite séché par lyophilisation.

Après analyses, il s'avère que ce complexe est constitué de protéines lipophilisées par des chaînes grasses, et environ 11 % des amines grasses ont été couplées à la protéine (à l'aide de liaisons covalentes comme des fonctions amides, mais également à l'aide de fonctions ioniques).

Ce complexe se présente sous la forme d'une poudre fine de couleur beige, d'odeur caractéristique. Il peut être utilisé dans une formulation cosmétique à 3 %, et grâce à l'amphiphilicité apportée par le greffage, il est possible de l'incorporer dans les phases aqueuse et/ou huileuse d'une préparation cosmétique.

#### Exemple 17 :

#### Préparation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)

100 g de protéine de blé soluble et de haute masse moléculaire moyenne (100 000 D) extraite du gluten de blé sont placés dans 5 000 ml d'eau déminéralisée. Le milieu réactionnel est ajusté à pH 11 par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 12N). Sous très forte agitation type Ultraturrax ou Silverson (10 000 à 20 000 rpm), 300 g d'un mélange de chlorures d'acides stéarique et palmitique sont alors lentement ajoutés. Le pH passe en quelques dizaines de minutes d'une valeur de 11 à une valeur proche de 1, lorsqu'aucun tampon n'est ajouté au milieu réactionnel. Après un temps de réaction d'une heure environ à température ambiante, l'ensemble est neutralisé jusqu'à un pH voisin de 7,0 par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH, 12N). L'ensemble est alors lyophilisé puis éventuellement stérilisé par rayons gamma ou bêta. Le produit se présente sous la forme d'une poudre pulvérulente blanche, qui peut aussi bien être placée dans les phases aqueuses que dans les phases huileuses de préparations, cosmétiques par exemple. Une partie des acides gras a réagi avec la protéine pour former des liaisons amides et esters, et une partie qui n'a pas réagi se trouve toutefois sous forme étroitement complexée par des liaisons hydrogènes et par des liaisons de type Van der Waals, à la protéine.

**Exemple 18 :****Préparation d'un complexe protéine d'amande-acides stéarique (C18) et palmitique (C16)**

On met en oeuvre la même technique de greffage que dans l'exemple 17 ci-dessus, mais une protéine d'amande, de masse moléculaire moyenne voisine de 30 000 D est utilisée à la place de la protéine de blé. La réaction est effectuée en régulant le pH à 11 par ajout de carbonate de sodium. Le complexe issu de ce greffage est conservé sous forme liquide et renferme 5 % de matière sèche ; 0,2 % de parabènes et 0,5 % de gomme de xanthane sont alors ajoutés. Le complexe ainsi formé est commercialisé sous la forme de cette solution ainsi décrite.

**Exemple 19 :**

On procède comme décrit dans les exemples 17 et 18 mais en opérant à des températures comprises entre 20 et 100°C. Les réactions de greffage réalisées à très hautes températures donnent des rendements plus importants mais donnent lieu à des dégradations modérées à sévères des protéines utilisées.

**Exemple 20 :****Préparation d'un complexe protéine d'avoine-hexadécylamine (C16)**

80 g de protéines d'avoine de masse moléculaire moyenne égale à 6 000 D sont placées dans 4 000 ml d'eau déminéralisée. Le milieu est neutralisé à pH 7,0. Une quantité suffisante de tampon phosphate est ajoutée de manière à obtenir un tampon phosphate 0,5 M dans le milieu réactionnel. 1 mole d'un carbodiimide comme par exemple 190 g de chlorhydrate de N-(diméthylamino-3-propyl)-N'-éthylcarbodiimide est alors ajoutée au mélange sous agitation ; 240 g de 1-hexadécylamine préalablement placée en suspension dans 2 000 ml d'eau portée à 80°C sont alors ajoutés au mélange réactionnel sous agitation mécanique très puissante (type Ultraturrax, 10 000 à 20 000 rpm). L'ensemble est conservé sous agitation 1 h à température ambiante ou 24 h à 6°C, puis est ajusté à un pH de 7,0. Il est ensuite éventuellement dialysé contre de l'eau distillée pendant 48 h à 6°C, éventuellement séché par lyophilisation, puis éventuellement stérilisé aux rayons bêta ou gamma.

La liaison covalente qui résulte de cette réaction fournit des liaisons amides, mais d'autres liaisons caractéristiques sont présentes entre l'amine grasse et le polypeptide, comme des liaisons ioniques et des liaisons de type Van der Waals.

**Tolérance et toxicité :**

Des études d'irritation cutanée et oculaire (réalisées selon des protocoles en accord avec les directives OCDE N° 404 (12 mai 1981) et N° 405 (24 février 1987), ont été réalisées avec plusieurs des produits obtenus selon les exemples ci-dessus (exemples 1 à 20) sous forme de solutions à 10 %. Dans tous les cas, les produits sont apparus comme "non irritants" (n'ont provoqué aucun signe d'irritation cutanée ou oculaire), et ont été extrêmement bien tolérés.

De même, l'administration par voie orale de doses maximales de 5 g de ces produits par kilogramme de poids corporel n'a provoqué aucune toxicité (tests effectués selon un protocole en accord avec la ligne directrice de l'OCDE concernant l'étude de la toxicité par voie orale (N° 401 (24 février 1987)).

Par ailleurs, des tests de sensibilisation selon le protocole de Magnusson et Kligman ont été réalisés avec ces produits en solution dans l'eau à 10 % et ces produits ont été classés parmi les produits ne possédant pas de propriété sensibilisante.

**Exemple 21 :****Formulation anti-âge, restructurante CC591**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Brij 72	Steareth 2	3
	Brij 721	Steareth 21	2
	Isostéaryl Isostéarate	Isostearyl Isostearate	4
	Huile de noyaux d'abricot	Apricot Kernel Oil	4
	Huile de safran	Safflower Oil	2
	Diméthicone 556	Dimethicone 556	2
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcool	3
B	Eau	Water	qsp 100
	Glycérine	Glycerin	5
	Produit de l'invention préparé selon l'exemple 2		6

C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
D	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
		Parfum	0,3
		Alpha tocophérol	0,05
		Alpha Tocopherol	

On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. On ajuste le pH de la phase B à la valeur de pH souhaitée. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D.

#### Exemple 22 :

#### Formulation anti-âge, visage CC585

10

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Isostéaryl Isostéarate	Isostearyl Isostearate	4
	Huile de Carthame	Safflower Oil	4
	Cétiol J600	Oleyl Erucate	2
	Diméthicone 556	Dimethicone	5
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcool	3
	Produit de l'invention réalisé selon l'exemple 17 :		3
B	Glycérine	Glycerin	5
	Eau	Water	qsp 100
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
D	Parfum	Perfume	0,3

On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la formule est conditionné dans ce cas par le pH du produit de

l'invention. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D. Si nécessaire, on ajuste la préparation au pH désiré, à l'aide d'acide lactique par exemple.

5

**Exemple 23 :**

**Formulation peaux sèches, visage**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Huile de bourrache	Borrage Oil	2
	Huile de Carthame	Safflower Oil	4
	Myritol 318	Caprylic/Capric triglyceride	6
	Crodacol CS50	Cetostearyl Alcohol	3
B	Glycérine	Glycerin	5
	Eau	Water	qsp 100
	Produit de l'invention selon l'exemple 2		4
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5
D	Parfum	Perfume	0,3

10 On chauffe séparément les phases A et B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On verse A dans B sous agitation très violente (du type Silverson ou Ultraturrax), puis on laisse chuter la température sous agitation lente. A 30°C, on rajoute les composants des phases C et D. Si nécessaire, on ajuste la préparation au pH désiré, à l'aide

15 d'acide lactique par exemple.

**Exemple 24 :**

**Formulation shampoing familial**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Texapon N40® (Henkel)	Sodium Laureth Sulfate	40
	Comperlan KD® (Henkel)	Cocamide DEA	2

B	Produit de l'invention selon l'exemple 17		0,3
	Eau	Water	qsp 100
	Chlorure de sodium	Sodium Chloride	1,5
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de ladite phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

#### Exemple 25 :

#### Formulation shampoing doux

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Tween 20® (ICI)	Polysorbate 20	10
	TegoBetaine L7® (Goldschmidt)	Cocamidopropyl Betaine	10
	Atlas G1821® (ICI)	PEG-150 Distearate	3
B	Produit de l'invention selon l'exemple 18		0,5
	Eau	Water	qsp 100
C	Phénonip®	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de ladite phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On homogénéise A sous agitation à 20°C. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

**Exemple 26 :****Formulation shampooing nacré**

Phase	Produits	Noms INCI	Quantités (%)
A	Texapon N40 <sup>®</sup> (Henkel)	Sodium Laureth Sulfate	40
	Comperlan KD <sup>®</sup> (Henkel)	Cocamide DEA	2
	Euperlan PK771 <sup>®</sup> (Henkel)	Glycol Distearate (and)	4
		Sodium Laureth Sulfate (and) Cocamide MEA (and) Laureth-10	
B	Produit de l'invention selon l'exemple 16		0,5
	Eau	Water	qsp 100
	Chlorure de sodium	Sodium Chloride	1,5
C	Phénonip <sup>®</sup>	Phenoxyethanol	0,5
		Methylparaben	
		Ethylparaben	
		Propylparaben	
		Butylparaben	
	Propylène glycol	Propylene Glycol	0,5

- 5 On chauffe séparément la phase B à 75°C, sous agitation modérée. Le pH de la phase B est ajusté au pH de la formulation désiré. On homogénéise B à 20°C. On verse B, dans A à 20°C, sous agitation très lente puis on laisse chuter la température. A 30°C, on rajoute la phase C.

10 **Exemple 27 :**

**Utilisation d'un complexe protéine de blé-acides stéarique et palmitique dans des applications cosmétiques "restructurantes" et permettant de lutter contre les effets du vieillissement**

- 15 Les complexes réalisés selon les exemples 3 (par voie enzymatique) et 17 (par voie chimique) ont été testés pour leur capacité à lisser le micro-relief cutané. En effet, l'aspect extérieur de la peau est révélateur de son état général, et les mailles formées par le réseau micro-dépressionnaire cutané ont tendance à s'agrandir et à se creuser au cours du vieillissement. D'autres facteurs extérieurs peuvent également contribuer à ce phénomène, comme par exemple l'utilisation
- 20 de détergents. Cette désorganisation du micro-relief est le signe d'une altération de la couche cornée et de sa fonction de barrière protectrice naturelle. Elle donne un



aspect rugueux et un toucher rêche au tégument, puis conduit à une déshydratation prononcée de celui-ci.

L'activité restructurante de ces complexes a été étudiée après une destruction importante du réseau micro-dépressionnaire, obtenue par une  
5 agression chimique du revêtement cutané à l'aide d'une solution aqueuse contenant 10 % de détergent (lauryl sulfate de sodium). Les essais ont été réalisés sur la face externe des deux mains de 10 volontaires. Chaque main a été lavée 4 fois par jour pendant 30 secondes, à 1/2 h d'intervalle, pendant 4 jours avec cette solution de détergent. Une des mains a reçu à l'issue de ces traitements, chaque jour, un  
10 traitement réalisé à partir d'une solution contenant 3 % du complexe réalisé selon l'exemple 3 ou 17 de l'invention. Chaque jour, la réparation cutanée a été évaluée comparativement aux zones témoins, agressées et non traitées, par observation directe de la surface cutanée au stéréo-microscope, et par étude des stripping. L'efficacité du complexe a été comparée à celle de la protéine de blé utilisée pour  
15 la réalisation dudit complexe ; les pouvoirs filmogènes et adoucissants de la protéine de blé étant bien connus.

Les deux produits (protéine et protéine complexée) améliorent nettement et d'une façon quasi-évidente l'aspect visuel de la surface cornée ; cependant, seul le complexe protéine de blé-acides gras selon l'invention, présente  
20 un pouvoir restructurant extrêmement important (voisin de 90 %), qui ne se limite pas à freiner l'agression due au détergent, mais qui permet une régénération de l'ensemble du tégument. Ainsi, les peaux traitées sont fréquemment en meilleur état après dégradation et application de la solution aqueuse du complexe préparé à l'exemple 3 ou 17, qu'avant tout traitement.

25 Ainsi, il est possible d'affirmer que le complexe protéine de blé-chaînes palmitique et stéarique est un actif cosmétique "régénérant", capable d'équilibrer et d'harmoniser la cohésion de l'épiderme.

#### Exemple 28 :

30 Utilisation d'un complexe protéine d'amande-acides stéarique et palmitique dans des applications cosmétiques permettant d'apaiser les agressions cutanées liées aux érythèmes solaires

Les complexes réalisés selon les exemples 4 (par voie enzymatique) et 18 (par voie chimique) ont été testés pour leur capacité à réduire et calmer les  
35 érythèmes solaires ; en effet, les coups de soleil répétés favorisent d'une part une altération des mécanismes biochimiques de la peau, par la destruction des lipides

des membranes cellulaires, par la fragmentation des macromolécules biologiques indispensables aux réparations cutanées, et d'autre part l'accélération du vieillissement cutané ; la conjonction de ces deux phénomènes pouvant parfois se traduire par l'apparition de cancers cutanés.

- 5 Le pouvoir anti-érythémateux du complexe protéine d'amande-acides stéarique et palmitique a été étudié chez le cobaye dont la réaction érythémale est bien corrélée à celle de l'homme. Les irradiations des animaux ont été réalisées à l'aide de 2 lampes Philipps TL 40W/12 émettant entre 280 et 340 nm avec un pic à 315 nm. Placé à 3 % au sein d'une émulsion (voir composition A ci-dessous), le
- 10 complexe réalisé selon l'exemple 4 ou 18 a été testé comparativement à une émulsion placebo (voir composition C ci-dessous) et à une émulsion contenant le polypeptide d'amande utilisé dans le complexe, sous forme non complexé (voir composition B ci-dessous). Dans chaque cas, 0,25 ml de produit a été administré immédiatement après irradiation, puis 2, 5 et 24 h après l'exposition. L'érythème
- 15 étant évalué selon une cotation visuelle de 0 (pas d'érythème) à 4 (érythème intense), l'effet réducteur d'érythème a été mesuré 2, 5, 24 et 48 h après l'irradiation, comparativement aux zones témoins irradiées mais non traitées. Les résultats ont ensuite été exprimés en pourcentage d'inhibition de l'érythème.

Phase	Ingrédients	A	B	C
A	Complexe décrit dans l'exemple 4 ou 18	3	0	0
	Polypeptide d'amande	0	0,75	0
	Eau	qsp 100	qsp 100	qsp 100
B	Huile de noyaux d'abricot	5	5	5
	Isostéaryl d'isostéarate	5	5	5
	Erucate d'oléyle	2	2	2
	Alcool cétostéarylique	3	3	3
C	Huile de silicone	2	2	2
	Parabènes	0,2	0,2	0,2

20

Préparation des compositions : Les phases A et B sont chauffées séparément à 75°C. Après une bonne homogénéisation, B est versé dans A sous agitation très intense, puis l'ensemble est porté à refroidir sous agitation lente. A 30°C, la phase C est alors ajoutée.

25

**Résultats :** Des érythèmes modérés ont été réalisés sur les cobayes. Ils correspondent à des érythèmes d'indice 1,5 à 24 h. L'effet adoucissant procuré par l'application d'une émulsion cosmétique de l'art antérieur (préparation placebo C) sur ces érythèmes, bien que sensible, reste insuffisant pour combattre efficacement le développement de la réaction inflammatoire. Par contre, le pouvoir anti-érythémateux du complexe (préparation A) est immédiat (inhibition de l'érythème d'environ 30 %, 2 h après l'application) et durable tout au long des traitements (inhibition de 45 %, 45 % et 65 % après respectivement 5, 24 et 48 h). La préparation réalisée avec le polypeptide d'amande non complexé (préparation B) ne permet pas non plus d'obtenir de tels résultats.

D'autres résultats ont été obtenus sur des érythèmes provoqués beaucoup plus prononcés (érythèmes d'indice 2 à 24 h). Dans ce cas, l'efficacité de la préparation A est encore plus prononcée par rapport aux efficacité obtenues avec les autres préparations.

Il est donc possible d'affirmer que le complexe protéine d'amande-chânes stéarique et palmitique, utilisé dans une formulation cosmétique, est un actif qui permet de réparer durablement les effets destructeurs des érythèmes solaires modérés voire forts, observés lors d'expositions solaires prolongées.

- Revendications -

1. Complexe amphiphile résultant de la réaction, à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, entre d'une part au moins une  
5 protéine dont la masse moléculaire moyenne est supérieure ou égale à 5 000 Daltons et d'autre part au moins une chaîne grasse dont le nombre d'atomes de carbone est compris entre 4 et 30, choisie parmi les acides gras, les alcools gras, les amines grasses et leurs dérivés à l'exclusion de l'acide undécylénique ; le rapport pondéral des réactifs [protéine(s)/chaîne(s) grasse(s)] variant de 1/1 à 1/10  
10 et avantageusement de 1/3 à 1/5.
2. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce que la protéine a une masse moléculaire moyenne comprise entre 10 000 et 1 000 000 Daltons, avantageusement entre 20 000 et 300 000 Daltons.
3. Complexe selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la  
15 chaîne grasse a un nombre d'atomes de carbone compris entre 6 et 20.
4. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il consiste en le produit de ladite réaction en mélange avec les chaînes grasses n'ayant pas réagi.
5. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé  
20 en ce que la protéine est d'origine animale ou végétale et est avantageusement choisie parmi le collagène, la gélatine, l'albumine, l'ovalbumine, l'élastine, la réticuline, la fibronectine, la kératine, la soie, la laminine, la desmosine, l'isodesmosine, les protéoglycannes de la matrice extra-cellulaire, les caséines, la lactalbumine, les lactoglobulines, les enzymes, les protéines ou hydrolysats  
25 modérés de blé, de maïs, de coton, de lupin, de pois, de fève, d'amande, de féverole, de soja, de tournesol, de luzerne, d'avoine.
6. Complexe selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la chaîne grasse est choisie parmi les acides gras heptanoïque, octanoïque, décanoïque, laurique, myristique, palmitique, stéarique, ricinoléique,  
30 oléique, linoléique, linolénique; les alcools gras et amines grasses correspondants; les dérivés desdits acides gras, alcools et amines ; et leurs mélanges.
7. Composition, notamment cosmétique, pharmaceutique ou alimentaire, renfermant à titre d'ingrédient actif au moins une protéine, caractérisée en ce qu'elle renferme, au moins en partie, ladite protéine sous la forme d'un complexe  
35 selon l'une quelconque des revendications précédentes.

8. Procédé de préparation d'un complexe amphiphile selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend la réaction dite de couplage, à une température comprise entre la température ambiante et 80°C, si nécessaire en milieu aqueux ou solvant, entre au moins une protéine du  
5 type précité et au moins une chaîne grasse du type précité, lesdits réactifs intervenant dans un rapport pondéral [protéine(s)/chaîne(s) grasse(s)] compris entre 1/1 et 1/10, avantageusement entre 1/3 et 1/5.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que, après ladite réaction, les complexes formés sont dispersés en phase aqueuse pour un ajustement  
10 de leur pH et éventuellement ensuite séchés.

10. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que les protéine(s) et chaîne(s) grasse(s) sont couplées par voie chimique en présence d'agents bifonctionnels couramment utilisés dans la synthèse peptidique ou en faisant intervenir les acides gras sous une forme réactive.

15 11. Procédé selon l'une des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que les protéine(s) et chaîne(s) grasse(s) sont couplées par voie enzymatique; les acides gras intervenant éventuellement sous forme d'esters (y compris d'esters de glycérides).

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit couplage  
20 enzymatique est mis en oeuvre à une température comprise entre 30 et 70°C, avantageusement entre 50 et 60°C.

13. Procédé selon l'une des revendications 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit couplage enzymatique est mis en oeuvre avec une acyltransférase ; avanta-  
geusement une lipase, telle une lipase de *Mucor miehei*, de pancréas de porc, de  
25 *Rhizopus arrhizus*, de *Candida*, de *Bacillus* ou d'*Aspergillus* ou avantageusement une protéase telle la papaïne ou avantageusement une amidase.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du milieu réactionnel est comprise entre 0,2 et 1 et avantageusement comprise entre 0,3 et 0,7.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 96/01620

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C07K14/415 A61K38/16 A61K7/075 A61K7/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 417 619 A (HOECHST) 20 March 1991 cited in the application see the whole document ---	1-14
A	DE 34 22 496 A (JENTSCH G.) 19 December 1985 cited in the application see page 11 - page 12 see page 1 - page 5 ---	1-14
A	EP 0 283 601 A (POLYDEX PHARMACEUTICALS LIMITED) 28 September 1988 cited in the application see the whole document ---	1-14
A	WO 93 22370 A (COLETICA) 11 November 1993 cited in the application see the whole document ---	1-14
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 1997

Date of mailing of the international search report

30.01.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreau, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 96/01620

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 234 475 A (SOKOL P.E.) 18 November 1980 cited in the application see the whole document ---	1-14
A	WO 92 13006 A (COLETICA) 6 August 1992 cited in the application see the whole document -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 96/01620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-417619	20-03-91	DE-A- 3929740	14-03-91
		CA-A- 2024782	08-03-91
		JP-A- 3130300	04-06-91
		US-A- 5071960	10-12-91
-----			
DE-A-3422496	19-12-85	NONE	
-----			
EP-A-283601	28-09-88	US-A- 4659740	21-04-87
-----			
WO-A-9322370	11-11-93	FR-A- 2690450	29-10-93
		CA-A- 2134346	28-10-94
		EP-A- 0638104	15-02-95
		JP-T- 8501112	06-02-96
-----			
US-A-4234475	18-11-80	CA-A- 1072952	04-03-80
-----			
WO-A-9213006	06-08-92	FR-A- 2671725	24-07-92
		CA-A- 2101246	24-07-92
		EP-A- 0568618	10-11-93
		JP-T- 6504570	26-05-94
		US-A- 5422111	06-06-95
-----			



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Doc. internationale No

PCT/FR 96/01620

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C07K14/415 A61K38/16

A61K7/075

A61K7/48

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 417 619 A (HOECHST) 20 Mars 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	DE 34 22 496 A (JENTSCH G.) 19 Décembre 1985 cité dans la demande voir page 11 - page 12 voir page 1 - page 5 ---	1-14
A	EP 0 283 601 A (POLYDEX PHARMACEUTICALS LIMITED) 28 Septembre 1988 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	WO 93 22370 A (COLETICA) 11 Novembre 1993 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
-/-		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

24 Janvier 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

3 0.01. 97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreau, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 96/01620

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 234 475 A (SOKOL P.E.) 18 Novembre 1980 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-14
A	WO 92 13006 A (COLETICA) 6 Août 1992 cité dans la demande voir le document en entier -----	1-14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 96/01620

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-417619	20-03-91	DE-A- 3929740 CA-A- 2024782 JP-A- 3130300 US-A- 5071960	14-03-91 08-03-91 04-06-91 10-12-91
DE-A-3422496	19-12-85	AUCUN	
EP-A-283601	28-09-88	US-A- 4659740	21-04-87
WO-A-9322370	11-11-93	FR-A- 2690450 CA-A- 2134346 EP-A- 0638104 JP-T- 8501112	29-10-93 28-10-94 15-02-95 06-02-96
US-A-4234475	18-11-80	CA-A- 1072952	04-03-80
WO-A-9213006	06-08-92	FR-A- 2671725 CA-A- 2101246 EP-A- 0568618 JP-T- 6504570 US-A- 5422111	24-07-92 24-07-92 10-11-93 26-05-94 06-06-95